

Índice

Abreviaturas.....	17
Resúmenes.....	23
1. Introducción.....	30
1.1 Mecanismos de Comunicación Celular	32
1.1.1 Vesículas Extracelulares: los Exosomas	35
1.1.1.1 Mecanismo de Formación y Liberación de las Vesículas Extracelulares	37
1.1.1.2 Reconocimiento y Señalización de las Vesículas Extracelulares en las Células Diana.....	39
1.1.1.3 Composición Citosólica y de la Membrana de las Vesículas Extracelulares	41
1.1.2 La Vía de Señalización de Notch	43
1.1.2.1 Activación de la Vía de Notch	44
1.1.2.2 Receptores y Ligandos de la Vía de Notch	46
1.1.2.2.1 Ligandos de la Vía de Notch.....	46
1.1.2.2.2 Receptores de la Vía de Notch	46
1.1.2.3 Interacción entre el Receptor y el Ligando de la Vía de Notch	48
1.1.2.4 Tráfico Endocítico de Componentes de Notch y las Ubiquitin Ligasas	51
1.2 Terapias Regenerativas.....	52
1.2.1 El Infarto Agudo de Miocardio (IAM) y Tratamiento Convencional	52
1.2.2 Terapias Avanzadas para el Tratamiento del IAM.....	55
1.2.3 Terapia Celular en el Tratamiento del IAM	56
1.2.3.1 Propiedades de las MSC.....	56
1.2.3.2 Efecto Terapéutico Inducido por las MSC: Hipótesis Paracrina	59
1.2.3.3 Respuesta a la Hipoxia: HIF-1 α	61
1.2.3.3.1 Relación entre Notch y HIF-1 α	64

1.2.4 Angiogenesis	64
1.2.4.1 Mecanismos Celulares en la Angiogénesis	65
1.2.4.2 Determinación del fenotipo celular CP o CC: La vía de señalización de Notch y VEGF	68
1.3 Cáncer	70
1.3.1 Mantenimiento de las Señales de Proliferación	72
1.3.1.1 Protooncogenes: C-MYC	74
1.3.1.2 Genes de Supresión Tumoral.....	75
1.3.2 Invasión y Metástasis: Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT)	76
1.3.2.1 Transición Epitelio Mesénquima (EMT): la Vía de Señalización de Notch.....	79
1.3.2.2 Transición Epitelio Mesénquima (EMT): Exosomas Tumorales	80
1.3.3 Cáncer de Mama	82
1.3.3.1 Subtipos Moleculares	83
2. Hipótesis y Objetivos	85
3. Materiales y métodos	90
3.1 Animales	92
3.2 Tipos Celulares	92
3.2.1 Cultivos Primarios	92
3.2.1.1 Cultivo Primario de Células Madre Mesenquimales	92
3.2.1.2 Cultivo Primario de Endotelio Humano.....	93
3.2.2 Líneas Celulares	93
3.2.3 Expansión Celular y Criopreservación	94
3.2.4 Recuento de la Viabilidad Celular	95

3.3 Técnicas de Genética Molecular	95
3.3.1 Transformación y Amplificación Bacteriana.....	97
3.3.2 Extracción y Purificación del DNA Plasmídico.....	97
3.3.3 Transducción Lentiviral.....	98
3.3.4 Síntesis de las Líneas MSC y HIF-MSC.....	100
3.3.5 Síntesis de las Líneas Transgénicas CD63-RFP para Monitorizar Exosomas	100
3.4 Co-Cultivos	101
3.5 Aislamiento de Exosomas	102
3.5.1 Medio de Recolección de Exosomas	102
3.5.2 Método de Ultracentrifugación	103
3.5.3 Purificación Mediante Ensayo de Afinidad	103
3.6 Técnicas Bioquímicas	103
3.6.1 Obtención de Extractos Proteicos	103
3.6.2 Cuantificación de Proteínas.....	104
3.6.3 Electroforesis en Geles de Poliacrilamida	104
3.6.4 Transferencia Mediante <i>Western Blot</i>	105
3.7 Técnicas Moleculares	107
3.7.1 Extracción y Cuantificación de RNA	107
3.7.2 Transcripción Reversa y PCR en Tiempo Real (qPCR).....	107
3.7.2.1 Transcripción Reversa: Síntesis de cDNA	107
3.7.2.2 Cuantificación Relativa de la Expresión Génica por PCR Cuantitativa en Tiempo Real.....	108
3.7.2.3 Análisis de los Resultados de qPCR	109
3.7.3 Identificación y Análisis de miRNAs de Exosomas Procedentes de MSC y HIF-MSC.....	109
3.7.3.1 Aislamiento de miRNAs Exosomales.....	110

3.7.3.2 Síntesis del cDNA a partir de los miRNAs Exosomales, qPCR y Análisis	110
3.8 Inmunocitoquímica.....	112
3.9 Técnicas de Imagen.....	113
3.9.1 Microscopía Óptica de Fluorescencia.....	113
3.9.2 Microscopía Confocal	113
3.9.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)	113
3.9.3.1 Adsorción y Fijación de los Exosomas en Rejillas para MET.....	114
3.9.3.2 Contrastado e Inclusión de los Exosomas	114
3.9.3.3 Inmunomarcaje con Oro de los Exosomas	115
3.9.4 Co-Cultivos: Análisis de la Transferencia de Exosomas	116
3.9.4.1 Microscopia Confocal <i>Time-Lapse</i>	116
3.9.4.1.1 Cuantificación de la Transferencia de Exosomas.....	117
3.9.5 Cuantificación de la Colocalización de NICD y CD63 en Cultivos de MDA-MB-231 y MCF-7	117
3.10 Cuantificación de la Síntesis y Secreción de Exosomas	118
3.10.1 <i>Western Blot</i>	118
3.10.2 Actividad Acetilcolinesterasa	118
3.11 Ensayos Funcionales <i>In Vitro</i> con Exosomas	119
3.11.1 Internalización de Exosomas	119
3.11.1.1 Internalización en HUVEC.....	119
3.11.1.2 Internalización en MCF-7	120
3.11.1.2.1 Tinción de Exosomas con Exo-Glow TM -Protein EV Labeling Kit.....	120
3.11.3 Estudio de la Actividad de la Vía de Señalización de Notch	121
3.11.3.1 Activación/Inhibición de la Vía de Notch.....	121
3.11.3.2 Análisis de la Vía de Notch en HUVEC.....	122

3.11.3.2.1 Inhibición del Ligando Jagged1 en Exosomas de MSC y de HIF-MSC	122
3.11.3.3 Análisis de la Vía de Notch en MCF-7.....	123
3.11.4 Ensayo de Formación de Tubos	124
3.11.5 Estudios de Proliferación y de Ciclo Celular en MCF-7	125
3.11.5.1 Estudios de Proliferación con Bromo Deoxiuridina (BrdU)	125
3.11.5.2 Estudio del Ciclo Celular por Citometría de Flujo en células MCF-7	126
3.11.6 Estudio del Proceso de Transición Epitelio-Mesénquima y la Migración en Cultivos de MCF-7	127
3.11.6.1 Análisis Mediante qPCR e Inmunomarcaje de Marcadores de EMT.....	127
3.11.6.2 Análisis de la Migración en MCF-7.....	127
3.12 Técnicas para el Estudio de la Angiogénesis <i>In vivo</i>: Plug de Matrigel	128
3.12.2 Grupos Experimentales.....	129
3.12.2 Procedimiento Quirúrgico	130
3.13 Técnicas de Histología.....	130
3.13.1 Inclusión en Parafina, Microtomía y Tinciones	130
3.13.2 Inmunocitoquímica	131
3.13.2.1 Desparafinado	131
3.13.2.2 Desenmascaramiento Antigénico.....	131
3.13.2.3 Inmunofluorescencia de CD31 de las Secciones de los Plug de Matrigel	132
3.13 Citometría de Flujo	132
3.14 Proteómica	133
3.15 Análisis Estadístico	133
4. Resultados	136
4. Resultados Sección A	139

4.1 Estabilización de la Expresión de HIF-1α en MSC.....	139
4.2 Aislamiento y Caracterización de los Exosomas Procedentes de MSC o HIF-MSC	142
4.3 HIF-1α Induce un Aumento en la Secreción de Exosomas en MSC	144
4.4 Análisis del Contenido de miRNAs y Proteínas en Exosomas de MSC y HIF- MSC.....	146
4.4.1 Contenido de miRNAs	147
4.4.2 Contenido en Proteínas	149
4.5 HIF-1α Incrementa la Incorporación del Ligando Jagged1 en los Exosomas de MSC	152
4.6 HIF-1α Induce un Aumento en la Transferencia de Exosomas de MSC a ECs	154
4.7 Actividad Funcional del Ligando Jagged1 Incorporado en Exosomas de MSC y HIF- MSC.....	156
4.8 HIF-1α Aumenta el Potencial Angiogénico de los Exosomas de MSC a través de Jagged1	158
4.8.1 Ensayo <i>In vitro</i> de Formación de Tubos	158
4.8.2 Ensayo <i>In Vivo</i> de <i>Plug</i> de Matrigel	160
4. Resultados Sección B	164
4.9 Aislamiento y Caracterización de los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7	164

4.10 Estudio de la Vía de Señalización de Notch en Exosomas Procedentes de MDA-MB-231	167
4.10.1 Estudio del Contenido Proteico de los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7	167
4.10.2 Los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 Incorporan una Mayor Cantidad de Componentes de la Vía de Señalización de Notch Respecto a los de MCF-7	172
4.10.3 Evaluación de la Actividad sobre la Vía de Señalización de Notch de los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7.....	173
4.10.3.1 Internalización y transferencia de Proteínas Exosomales Procedentes de MDA-MB-231 o de MCF-7 en Células MCF-7	175
4.10.4 Los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 Inducen Cambios en Genes Diana de la Vía de Notch al ser Agregados a Cultivos de MCF-7	176
4.11 Participación de los Componentes de la Vía de Notch Contenidos en Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 y de MCF-7 en la Proliferación Celular de MCF-7	178
4.12 Los Exosomas Procedentes de MDA-MB-231 Inducen el Proceso de EMT en Cultivos de MCF-7 en Parte Debido a N1ICD.....	181
4.12.1 Análisis de Características Morfológicas del Proceso de EMT en Cultivos de MCF-7	181
4.12.2 Detección de Marcadores de EMT Mediante Inmunofluorescencia en Cultivos de MCF-7	184
4.12.3 Análisis de la Expresión Génica de Marcadores de EMT Mediante qPCR en Cultivos de MCF-7	187
4.12.4 Ensayo <i>In vitro</i> para Estudiar la Movilidad Celular en Cultivos de MCF-7	188
5. Discusión.....	192
5.1 Sección A: Estudio de la contribución de los exosomas procedentes de MSC nativas y de HIF-MSC a su potencial angiogénico.....	194
5.2 Sección B: Papel de la vía de señalización de Notch en el proceso de malignización mediado por exosomas procedentes de la línea celular de cáncer de mama metastático MDA-MB-231.	202
6. Conclusiones	211
7. Bibliografía	217